

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional(43) Fecha de publicación internacional  
21 de Noviembre de 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 02/092633 A1(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>1</sup>: C07K 16/16

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES02/00208

(22) Fecha de presentación internacional:  
3 de Mayo de 2002 (03.05.2002)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P 200101098 14 de Mayo de 2001 (14.05.2001) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

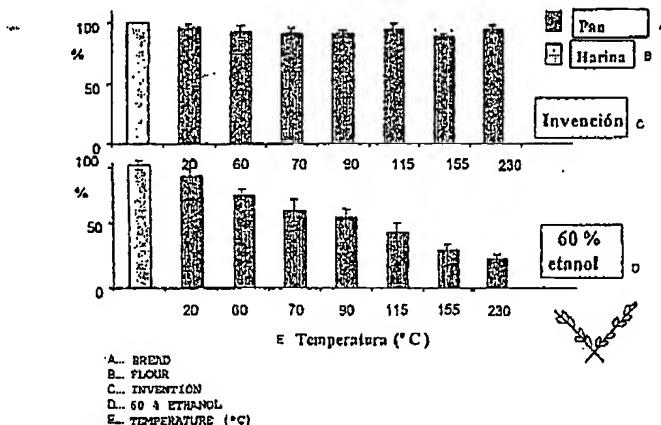
(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): LÓPEZ VILLAR, Elena [ES/ES]; Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). LLLORENTE GÓMEZ, Mercedes [ES/ES]; Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). MENÉDEZ CORMÁN, Enrique [ES/ES]; Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).

(74) Mandatario: REPRESA SÁNCHEZ, Domingo; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Oficina de Transferencia de Tecnología, C/Serrano, 113 - 2<sup>a</sup> planta, E-28006 Madrid (ES).*[Continúa en la página siguiente]*

(54) Title: METHOD FOR EXTRACTING GLUTEN CONTAINED IN HEAT-PROCESSED AND NON-HEAT-PROCESSED FOODSTUFFS, COMPATIBLE WITH AN ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY, COMPOSITION AND KITS COMPRISING SAID COMPOSITION

(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS, PROCESADOS Y NO PROCESADOS POR CALOR, COMPATIBLE CON ELISA, COMPOSICIÓN Y KITS QUE COMPRENDEN DICHA COMPOSICIÓN

WO 02/092633 A1



(57) Abstract: The invention relates to a method for extracting the gluten contained in a sample consisting in using an ethanol aqueous solution in the presence of a composition containing a disulphur group reducer and a decoupling agent, in a buffer having a pH of between 7 and 8. The inventive method can be used to extract quantitatively the gluten contained in a heat-processed or non-heat-processed food sample before the quantification of the gluten by ELISA. Said method is suitable for food analyses, in particular, for foodstuffs intended for coeliac sufferers.

2/28

*[Continúa en la página siguiente]*

WO 02/092633 A1

- (81) **Estados designados (nacional):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados designados (regional):** patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

---

(57) **Resumen:** El procedimiento comprende extraer el gluten contenido en dicha muestra con una solución acoosa de etanol en presencia de una composición que comprende un agente reducir de grupos disulfuro y un agente disociante, en un tampón de pH comprendido entre 7 y 8. El procedimiento permite extraer cuantitativamente el gluten contenido en una muestra de un alimento, tanto procesado por calor como no procesado por calor, como paso previo a la cuantificación por ELISA del gluten. De aplicación en el análisis de alimentos, en particular, de los alimentos destinados a los enfermos celíacos.

3/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

1

PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS,  
PROCESADOS Y NO PROCESADOS POR CALOR, COMPATIBLE CON ELISA,  
COMPOSICIÓN Y KITS QUE COMPRENDEN DICHAS COMPOSICIÓN

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona, en general, con el análisis de alimentos para enfermos celiacos, y, en particular, se refiere a un procedimiento para la extracción de gluten en alimentos, compatible con un ensayo de inmunoabsorción con 10 enzimas ligadas (ELISA), a composiciones adecuadas para la puesta en práctica de dicho procedimiento, a kits que comprenden dichas composiciones y a un método para la cuantificación por ELISA del gluten presente en un alimento.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La Enfermedad Celiaca (EC) es una enfermedad caracterizada por una intolerancia a las prolaminas del gluten de trigo, cebada, centeno y avena, que provoca cambios en el intestino que conllevan a una malabsorción.

20 El gluten comprende una mezcla compleja de proteínas y, mientras no se conozca el componente o componentes tóxicos del gluten causantes de la EC, la solución provisional consiste en la eliminación de todos los componentes del gluten en la dieta de estos enfermos. De hecho, el único 25 tratamiento realmente eficaz para los pacientes celiacos consiste en seguir una dieta estrictamente libre de gluten. Por este motivo, resulta esencial la cuantificación precisa del contenido en gluten de los alimentos destinados a ser ingeridos por los enfermos celiacos.

30 Sin embargo, la medida fiable del contenido en gluten de los alimentos ha sido una de las asignaturas pendientes en los últimos años. Actualmente el gluten se determina por métodos epitopo-dependientes, tipo ELISA, que emplean anticuerpos monoclonales o policlonales. Un ELISA útil para

4/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

2

cuantificar el gluten contenido en alimentos lo describen L. Sorell et al., en el articulo titulado *"An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis"*, publicado en *FEBS letters*, 439, 46-50

5 (1988)..

El protocolo rutinario de análisis de gluten en alimentos para celiacos, tanto procesados por calor como no procesados por calor, consiste en una extracción del gluten con una solución acuosa de etanol al 60% (60% etanol/agua) 10 seguido de su cuantificación por ELISA.

Uno de los grandes problemas relacionados con la analítica del gluten en alimentos radica en que una gran parte de los alimentos para celiacos son procesados durante su elaboración a elevadas temperaturas (150-220°C). Debido a 15 este tratamiento térmico, la mayoría de las fracciones tóxicas del gluten ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -gliadinas) se desnaturalizan y se hacen insolubles por lo que no pueden ser extraídas con 60% etanol/agua. Como consecuencia de ello, el contenido en gluten de estos alimentos procesados por calor, 20 independientemente del ELISA utilizado, no resulta fiable.

#### COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La invención se enfrenta con el problema de desarrollar un procedimiento para la extracción cuantitativa del gluten 25 contenido en alimentos, compatible con los ELISA actualmente existentes para la cuantificación de gluten en alimentos.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han observado que el empleo de una composición que comprende un agente reductor de grupos 30 disulfuro y un agente disociante en un tampón de pH comprendido entre 7 y 8, antes de extraer el gluten con una solución acuosa de etanol al 60%, solubiliza las fracciones tóxicas del gluten, lo que permite analizar cuantitativamente el gluten contenido en alimentos.

5/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

## 3

El rendimiento de extracción de gluten en alimentos alcanzado mediante el procedimiento desarrollado por esta invención es muy superior al obtenido mediante el sistema convencional de extracción de gluten basado únicamente en el empleo de 60% etanol/agua, tal como se muestra en las Tablas 5 1 y 2 (véanse los Ejemplos 1 y 3). Asimismo, la recuperación de gluten tanto en alimentos procesados por calor como en alimentos no procesados por calor es prácticamente cuantitativa, tal como se pone de manifiesto en la Figura 1 10 (véase el Ejemplo 2).

Un objeto de esta invención lo constituye un procedimiento para la extracción de gluten en alimentos, compatible con ELISA, que comprende efectuar la extracción 15 del gluten con una solución acuosa de etanol en presencia de una composición que contiene un agente reductor de grupos disulfuro y un agente disociante en un tampón con un pH comprendido entre 7 y 8.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye dicha composición útil para la puesta en práctica de dicho 20 procedimiento de extracción de gluten en alimentos.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un método para la cuantificación por ELISA del gluten presente en una muestra de un alimento que comprende la extracción previa del gluten contenido en dicha muestra mediante el 25 procedimiento de extracción de gluten previamente mencionado.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un kit que comprende dicha composición útil para la puesta en práctica de dicho procedimiento de extracción de gluten en alimentos, o sus componentes por separado. Dicho kit puede 30 ser utilizado para extraer el gluten contenido en un alimento como paso previo a la cuantificación por ELISA del gluten contenido en un alimento.

6/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

4

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La Figura 1 es un diagrama de barras que representa el porcentaje de recuperación de gluten tanto en panes procesados a distintas temperaturas como en la harina con la 5 que se han fabricado dichos panes, extraido mediante el procedimiento de extracción de gluten proporcionado por esta invención [INVENCIÓN] o mediante un método de referencia [60% ETANOL] (véase el Ejemplo 2).

**10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

La invención proporciona una composición, en adelante composición de la invención, que comprende un agente reductor de grupos disulfuro y un agente disociante, en un tampón de pH comprendido entre 7 y 8.

15 El agente reductor de grupos disulfuro puede ser cualquier compuesto capaz de reducir grupos disulfuro, por ejemplo, 2-mercptoetanol (2-ME), ditiotreitol, etc., y sus mezclas. La concentración del agente reductor de grupos disulfuro en la composición de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo, entre otras cosas, 20 del agente reductor de grupos disulfuro en cuestión.

El agente disociante puede ser cualquier compuesto con la capacidad de abrir la conformación de las proteínas haciendo más accesible determinadas zonas de la cadena 25 polipeptídica a reactivos externos y anticuerpos, por ejemplo, hidrocloruro de guanidina, urea, etc., y sus mezclas. La concentración del agente disociante en la composición de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo, entre otras cosas, del agente 30 disociante en cuestión. En una realización particular, el agente disociante es hidrocloruro de guanidina, y la concentración de dicho compuesto en la composición de la invención está comprendida entre 1 y 6 M. Análogamente, en otra realización particular, el agente disociante es urea y 35 la concentración de dicho compuesto en la composición de la

7/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

5

invención está comprendida entre 1 y 5 M.

El tampón puede ser cualquier disolución reguladora del pH de una disolución que tampona a un valor de pH comprendido entre 7 y 8, por ejemplo, solución salina con fosfatos (PBS) 5 con un pH comprendido entre 7 y 8, Tris con un pH comprendido entre 7 y 8, etc.

En una realización particular de la composición de la invención, el agente reductor de grupos disulfuro es el 2-ME, el agente disociante es el hidrocloruro de guanidina, y el 10 tampón es PBS con un pH comprendido entre 7 y 8.

La composición de la invención es útil como "cóctel" de extracción de gluten en alimentos, tanto procesados por calor como no procesados por calor. Ha resultado sorprendente comprobar que el empleo de la composición de la invención en 15 la extracción de gluten (que contiene un agente reductor de grupos disulfuro y un agente disociante en un tampón con un pH determinado) no afecta adversamente a la cuantificación por ELISA del gluten contenido en un alimento.

La invención también proporciona un procedimiento para 20 la extracción de gluten en una muestra de un alimento, en adelante procedimiento de la invención, que comprende extraer el gluten contenido en dicha muestra con una solución acuosa de etanol en presencia de la composición de la invención.

De forma más concreta, el procedimiento de la invención, 25 que comprende extraer el gluten con una solución acuosa de etanol y separar el sobrenadante que contiene el gluten extraído, se caracteriza porque antes de la extracción con dicha solución acuosa de etanol, la muestra a ensayar se mezcla con la composición de la invención, se incuba a una 30 temperatura comprendida entre 37°C y 50°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 y 60 minutos, y se enfria hasta temperatura ambiente.

La concentración de etanol en la solución acuosa de etanol puede variar dentro de un amplio intervalo. En una 35 realización particular, dicha solución acuosa de etanol tiene

3/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

6

un contenido en etanol comprendido entre el 50% y el 70%.

La muestra de alimento a ensayar se prepara por los métodos convencionales, que incluyen, en su caso, la molienda de la muestra, y se deposita en un recipiente apropiado, por ejemplo, un tubo de propileno. A continuación, se añade la composición de la invención, se cierra el recipiente y la mezcla resultante se agita. Ventajosamente, el recipiente que contiene dicha mezcla se sella, por ejemplo, con papel parafilm, con el fin de evitar la evaporación de dicha mezcla por acción del calor. En una realización particular, la incubación de la muestra con la composición de la invención se efectúa a una temperatura de 50°C durante 40 minutos. Finalizada la incubación, la mezcla resultante se deja enfriar hasta temperatura ambiente (entre 15°C y 25°C). A continuación, se añade una solución acuosa de etanol, tal como una solución acuosa de etanol al 60%, a dicha mezcla y se incuba a una temperatura y durante un periodo de tiempo apropiado, por ejemplo, a temperatura ambiente durante 1 hora, con agitación. Posteriormente, la mezcla de reacción se centrifuga, se retira el sobrenadante (que contiene el gluten extraído) y, finalmente, se cuantifica el contenido en gluten mediante un ELISA del tipo habitualmente utilizado en la cuantificación de gluten en alimentos.

Mediante el procedimiento de la invención se solubiliza prácticamente la totalidad de las fracciones tóxicas del gluten contenido en alimentos, tanto procesados por calor como no procesados por calor. Aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría, se cree que la composición de la invención actúa abriendo la conformación de las proteínas constituyentes del gluten, en particular, de la fracción tóxica del mismo, y, como consecuencia de ello, se favorece su solubilidad en el medio de extracción. Efectivamente, durante el procesamiento térmico de los alimentos, las fracciones del gluten (las  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -gliadinas) se desnaturalizan, se rompen los puentes disulfuro y,

9/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

7

consecuentemente, se forman agregados insolubles que no pueden ser extraídos con 60% etanol/agua. El efecto combinado de los componentes de la composición de la invención hace que (i) el agregado insoluble pueda ser extraído con una solución acuosa de etanol (50-70% etanol/agua) y cuantificado por ELISA y (ii) que aumente la conformación de las moléculas de gluten quedando los determinantes antigenicos más expuestos a los anticuerpos, lo que provoca un aumento en la señal de ELISA.

10 No se conocen procedimientos de extracción cuantitativa de gluten en alimentos compatibles con los ELISA disponibles para su cuantificación. Ha resultado sorprendente comprobar que el empleo de un agente reductor de puentes disulfuro, tal como 2-ME, en combinación con un agente disociante, tal como 15 hidrocloruro de guanidina, permite extraer cuantitativamente (véase el Ejemplo 2) el gluten contenido tanto en alimentos procesados por calor como en alimentos no tratados con calor, sin afectar adversamente a su cuantificación por ELISA. Los resultados mostrados en la Figura 1 (Ejemplo 2) indican 20 claramente que el procedimiento de la invención constituye una herramienta muy apropiada previa a la cuantificación por ELISA del gluten en alimentos para celiacos procesados y no procesados por calor.

El procedimiento de la invención, parece constituir, por 25 tanto, un procedimiento general de extracción de gluten de alimentos, especialmente destinados a los enfermos celiacos, tanto procesados por calor como no procesados por calor, que solubiliza las fracciones tóxicas del gluten permitiendo analizar cuantitativamente el gluten en este tipo de 30 alimentos.

La invención también proporciona un método para la cuantificación por ELISA del gluten presente en una muestra de un alimento que comprende extraer el gluten contenido en dicha muestra mediante el procedimiento de la invención y, a 35 continuación, cuantificar por ELISA el gluten previamente

10/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

8

extraido.

La invención también proporciona un kit que comprende la composición de la invención, o los componentes de dicha composición parcialmente mezclados o separados. Este kit 5 puede ser utilizado para extraer el gluten contenido en una muestra de un alimento, tanto procesado por calor como no procesado por calor, o bien, para extraer el gluten como paso previo a su cuantificación por ELISA con el fin de determinar el contenido en gluten de la muestra de alimento ensayada. El 10 kit puede contener, además, el resto de reactivos necesarios para la extracción del gluten, es decir, la solución acuosa de etanol o bien sus componentes por separado, y/o los reactivos necesarios para la realización de un ELISA para cuantificar el gluten contenido en un alimento, mezclados 15 total o parcialmente entre sí o separados.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

20

#### EJEMPLO 1

##### Recuperación de gluten en alimentos procesados con calor

Se realizó este ensayo para comparar la eficacia del procedimiento proporcionado por esta invención en la extracción de gluten en alimentos procesados por calor, a 25 diferentes temperaturas, frente a la del método utilizado habitualmente (Método de referencia).

###### 1.1 Materiales

Para la realización de este ejemplo se utilizaron los 30 siguientes alimentos:

A) Alimentos sometidos a temperaturas elevadas durante el proceso de elaboración (180-220°C):

A.1) "sin gluten" pero contaminados de gluten (es decir, 35 alimentos donde se declara que no contienen gluten

1/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

9

pero que, en realidad si contienen gluten);

A.2) alimentos que contienen gluten; y

A.3) alimentos "sin gluten" no contaminados de gluten

(es decir, alimentos que no contienen gluten y se utilizan como controles).

5

B) Alimentos sometidos a temperaturas intermedias (110°C aproximadamente): almidones contaminados con gluten.

10

#### 1.2 Método de referencia

El método de referencia es el método utilizado actualmente en la extracción de gluten utilizando una solución acuosa de etanol al 60%.

15

Para la realización de este método se pesan 0,125 g de la muestra de alimento molida y se depositan en un tubo de propileno de 10 ml. A continuación, se añaden 5 ml de solución 60% etanol y la mezcla de reacción se incuba durante 1 hora, a temperatura ambiente, en un agitador rotatorio [Modelo LABINCO BV (posición 2-3)]. Finalizada la incubación, las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 3.500 rpm (2.500 g), a temperatura ambiente (Centrifuga 5810 Eppendorf), y el sobrenadante se pasa a unos tubos de propileno limpios de 10 ml y, a continuación, se analizan mediante un ELISA basado en un único anticuerpo monoclonal R5, utilizado como captura conjugado a peroxidasa de rábano picante [este ELISA es similar al descrito por L. Sorell et al., FEBS Letters, 439, 46-50 (1988) excepto que, en este caso, el sandwich del ELISA está basado en un único anticuerpo monoclonal R5, utilizado como captura y conjugado a peroxidasa de rábano picante; este ELISA permite cuantificar el gluten de trigo, cebada y centeno con una sensibilidad de detección de 1,5 ppm].

20

La solución acuosa de etanol al 60% se prepara mezclando, por ejemplo en una probeta, 300 ml de etanol (Scharlau Nv 121) y 200 ml de agua milli-Q (resistividad 18

25

12/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

10

MΩcm) y se guarda en frasco de vidrio.

### 1.3 Procedimiento de la invención

El procedimiento de la invención consiste en efectuar la extracción de gluten utilizando una solución acuosa de etanol al 60% en presencia de un agente reductor y de un agente disociante y en presencia de un tampón de pH 7-8.

Para la realización de este procedimiento se pesan 0,125 g de la muestra de alimento molida y se depositan en un tubo de propileno de 10 ml. A continuación, se añaden 1,25 ml de una composición (cóctel de extracción) constituida por 2-ME 250 mM, hidrocloruro de guanidina 2 M y 0,1x PBS. Los tubos se cierran con el tapón de rosca/presión y se sellan con papel parafilm para evitar la evaporación por el calor. La mezcla de reacción se mezcla en un vortex y se incuba en una estufa a 50°C durante 40 minutos. Finalizada la incubación, la mezcla de reacción se deja enfriar hasta temperatura ambiente, y se añaden 3,75 ml de una solución acuosa al 80% de etanol a la mezcla de reacción y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador rotatorio [Modelo LABINCO BV (posición 2-3)]. Posteriormente, las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 3.500 rpm (2.500 g) a temperatura ambiente (Centrifuga 5810 Eppendorf) y el sobrenadante se pasa a tubos de propileno limpios de 10 ml de propileno y, a continuación, se analizan por ELISA.

La solución acuosa de etanol al 80% se prepara mezclando, por ejemplo en una probeta, 400 ml de etanol (Scharlau Nv 121) y 100 ml de agua milli-Q (resistividad 18 MΩcm) y se guarda en frasco de vidrio.

La composición o cóctel de extracción, constituida por 2-ME 250 mM, hidrocloruro de guanidina 2 M y 0,1x PBS, se prepara, por ejemplo, pesando 3,8 g de hidrocloruro de guanidina Mr 95,53 (Fluka 50940) y añadiendo 15-18 ml de una solución de PBS (0,1x). A continuación se añaden 349 µl de 2-ME 14,29 M (Sigma M-6250), se enrasa hasta 20 ml con solución

13/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

## 11

PBS (0,1x) y se mezcla hasta disolución total.

La solución de PBS 0,1x se puede preparar diluyendo 1:100 una solución de PBS 10x. Para ello, se añade 1 ml de PBS 10x en una probeta y se enrasa hasta 100 ml con agua milli-Q (resistividad 18 MΩcm). La solución resultante debe tener un pH comprendido entre 7 y 8. La solución de PBS 10x se puede preparar mezclando y disolviendo 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 2,4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, en 900-950 ml de agua destilada, en un vaso de precipitado de 1 l con agitación magnética y enrascando la solución resultante con agua destilada hasta 1.000 ml en un matraz aforado. La solución obtenida se almacena a temperatura ambiente.

#### 1.4 Resultados

La Tabla 1 muestra los valores de ELISA de 23 muestras de alimentos ("sin gluten" pero contaminados de gluten, alimentos que contienen gluten, y almidones contaminados con gluten) que han sido tratados a temperaturas elevadas, y 3 controles de alimentos "sin gluten" no contaminados de gluten.

En dicha Tabla 1 puede apreciarse claramente, en las 23 muestras ensayadas, un aumento en el porcentaje de gluten extraído con el procedimiento de la invención. El incremento del valor oscila entre aproximadamente un 30% y aproximadamente un 173% en la mayoría de los alimentos excepto en los 3 controles. El porcentaje medio del incremento del valor del gluten en estos alimentos es de un 70,4%.

14/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

12

Tabla 1

**Análisis de gluten en alimentos procesados con calor  
extraídos con 60% etanol y con el cóctel de extracción**

	Muestra	60% Etanol	Cóctel de Extracción	% Aumento
5	4064	1,5	4,1	173,3
	4062	9,2	9,5	3,3
10	"Sin gluten" contaminadas	3,9	6,2	59,0
		4,1	10,3	151,2
15	1143	3,9	7,9	102,6
	3177	4,1	9,2	124,4
220°C				
20	3569	13,9	25,5	83,5
	3576	8,4	21,3	153,6
25	"gluten"	15,4	20,7	34,4
		3,1	4,2	35,5
	3579	7,6	7,9	3,9
110°C "Almidones"				
30	"gluten"	2162	4,0	72,5
		4146	2,0	85,0
		2159	6,5	44,6
		2160	5,0	38,0
		2161	3,0	36,7
		3592	8,2	73,2
220°C "Sin gluten"				
35	3428	<0,15	<0,15	0,0
		<0,15	<0,15	0,0
		<0,15	<0,15	0,0
				70,4

15/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

13

**EJEMPLO 2****Recuperación cuantitativa de gluten  
en alimentos procesados con calor**

Este ensayo pone de manifiesto la recuperación  
5 cuantitativa de gluten, obtenida mediante el procedimiento  
proporcionado por esta invención, en alimentos procesados con  
calor, a diferentes temperaturas, frente a la recuperación no  
cuantitativa de gluten obtenida utilizando el método de  
extracción habitual con etanol 60% (Método de referencia).

10

**2.1 Materiales**

Para la realización de este ejemplo se utilizaron:

- 15 1) panes elaborados a temperaturas diferentes: 20°C,  
60°C, 70°C, 90°C, 115°C, 150°C y 220°C; y
- 2) la harina con la que se elaboraron dichos panes.

**2.2 Método de referencia**

20 El método de referencia es el método utilizado  
actualmente en la extracción de gluten utilizando una  
solución acuosa de etanol al 60% [véase el Ejemplo 1.2].

**2.3 Procedimiento de la invención**

25 El procedimiento de la invención consiste en efectuar la  
extracción de gluten utilizando una solución acuosa de etanol  
al 60% en presencia de un agente reductor y de un agente  
disociante y en presencia de un tampón de pH 7-8 [véase el  
Ejemplo 1.3].

30

**2.4 Resultados**

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1, que  
representa el porcentaje de la recuperación de gluten en  
panes procesados a distintas temperaturas y en la harina con

16/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

14

la que se han fabricado dichos panes, y extraído mediante el método de referencia o mediante el procedimiento de la invención. En el eje de abscisas se representan las temperaturas del procesamiento del pan y en ordenadas se representa el porcentaje de recuperación de gluten, considerando el porcentaje recuperado en la harina utilizada para fabricar dichos panes como el 100%. En dicha Figura 1 se pone de manifiesto claramente la recuperación cuantitativa de gluten en los panes procesados a diferentes temperaturas (prácticamente del 100% a cualquier temperatura de procesado del pan) mediante el empleo del procedimiento de la invención frente a la recuperación no cuantitativa obtenida utilizando el método de referencia (60% etanol), observándose en este caso una reducción continua y progresiva del gluten recuperado (la recuperación de gluten disminuye proporcionalmente a medida que aumenta la temperatura de procesado del pan).

#### EJEMPLO 3

20 Recuperación de gluten en alimentos no tratados con calor  
Se realizó este ensayo para comparar la eficacia del procedimiento proporcionado por esta invención en la extracción de gluten en alimentos no tratados con calor, frente a la del método utilizado habitualmente (Método de referencia).

##### 3.1 Materiales

Para la realización de este ejemplo se utilizaron 7 muestras de harina de trigo (Tr) y 1 de centeno (Cn) sin tratar con calor (véase la Tabla 2).

##### 3.2 Método de referencia

El método de referencia es el método utilizado actualmente en la extracción de gluten utilizando una solución acuosa de etanol al 60% (véase el Ejemplo 1.2).

1728

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

15

3.3 Procedimiento de la invención

El procedimiento de la invención consiste en efectuar la extracción de gluten utilizando una solución acuosa de etanol al 60% en presencia de un agente reductor y de un agente disociante y en presencia de un tampón de pH 7-8 [véase el Ejemplo 1.3].

3.4 Resultados

La Tabla 2 muestra los valores de ELISA de 8 muestras de alimentos no tratados con calor. En dicha Tabla 2 puede apreciarse claramente, en las 8 muestras ensayadas, un aumento en el porcentaje de gluten extraído con el procedimiento de la invención. El incremento del valor oscila entre aproximadamente un 12% y aproximadamente un 47% en todos los alimentos incluidos los controles. El porcentaje medio del incremento del valor del gluten en estos alimentos es de un 27,3%.

20

## Tabla 2

Análisis de gluten en alimentos no tratados con calor extraídos con 60% etanol y con el cóctel de extracción

25	↳	Muestra	60% Etanol	Cóctel de Extracción	% Aumento
		Tr I	5,6	8,2	46,4
		Tr II	3,2	3,6	12,5
		Tr III	5,6	8,1	44,6
30		Tr IV	5,2	6,1	17,3
		Tr V	4,3	5,1	18,6
		Tr VI	8,1	9,5	17,3
		Tr VII	1,4	1,8	28,6
		Cn I	7,3	9,7	<u>32,9</u>
35					27,3

18/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

16

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un agente reductor de grupos disulfuro y un agente disociante, en un tampón de pH comprendido entre 7 y 8.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho agente reductor de grupos disulfuro se selecciona entre 2-mercptoetanol, ditiotreitol y sus mezclas.
3. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho agente disociante se selecciona entre hidrocloruro de guanidina, urea y sus mezclas.
4. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho tampón es una solución salina con fosfatos (PBS) con un pH comprendido entre 7 y 8 o Tris pH entre 7 y 8.
5. Un procedimiento para la extracción de gluten en una muestra de un alimento que comprende extraer el gluten contenido en dicha muestra con una solución acuosa de etanol en presencia de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicha solución acuosa de etanol tiene un contenido en etanol comprendido entre 50% y 70%.

19/  
22

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

17

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, que comprende mezclar la muestra a ensayar con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, incubar la mezcla resultante a una temperatura comprendida entre 37°C y 50°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 y 60 minutos, enfriar hasta temperatura ambiente, añadir una solución acuosa de etanol y separar el sobrenadante que contiene el gluten extraído.

10 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la incubación de la muestra con dicha composición se efectúa a una temperatura de 50°C durante 40 minutos.

15 9. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha solución acuosa de etanol es una solución acuosa de etanol al 60%.

20 10. Procedimiento según la reivindicación 7, que comprende, además, incubar la mezcla que contiene la muestra a ensayar, la composición de las reivindicaciones 1 a 4 y la solución acuosa de etanol.

25 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la incubación de la mezcla que contiene la muestra a ensayar, la composición de las reivindicaciones 1 a 4 y la solución acuosa de etanol, se efectúa a temperatura ambiente durante 1 hora.

30 12. Un método para la cuantificación por ELISA del gluten presente en una muestra de un alimento que comprende extraer el gluten contenido en dicha muestra mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, y, a continuación, cuantificar por ELISA el gluten extraído.

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

18

13. Un kit que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o los componentes de dicha composición parcialmente mezclados o separados.

5 14. Kit según la reivindicación 13, que comprende, además, una solución acuosa de etanol o los componentes de dicha solución acuosa de etanol por separado.

10 15. Kit según la reivindicación 13, que comprende, además, los reactivos necesarios para la realización de un ELISA para cuantificar el gluten contenido en un alimento, mezclados total o parcialmente entre sí o separados.

21/28

WO 02/092633

PCT/ES02/00208

1/1

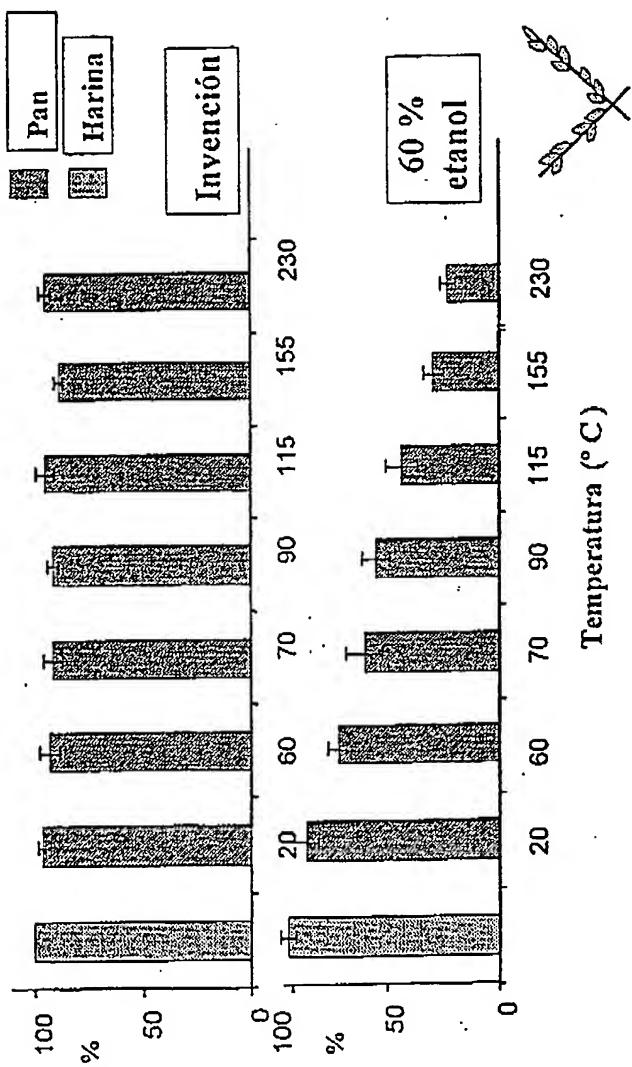


Figura 1

22/28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/ES02/00208
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K 16/16 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  EPÓQUE, STN, CIBEPAT		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GB 2207921 A (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 15.02.1989 The whole document	1-15
A	PETER J. FRAZIER et al. Lipid-protein Interaction During Dough Development. J. Sci. Food Agric. 1981. Vol.32 pag.877-897.	1-15
A	ARIS GRAVELAND et al. Extraction and Fraction of Wheat Flour Proteins. J. Sc. Food Agric. 1982. Vol.33 pag.1117-1128.	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 24 September 2002 (24.09.2002)	Date of mailing of the international search report 26 September 2002 (26.09.2002)	
Name and mailing address of the ISA/  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family membersInternational Application No  
PCT/ES02/00208

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB2207921	15.02.1989	AU1891788 AU611921 CA1294903	12.01.1989 27.06.1991 28.01.1992

## INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES02/00208

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> C07K 16/16

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)  
CIP<sup>7</sup> C07K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPOQUE, STN, CIBEPAT

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	GB 2207921 A (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 15.02.1989 todo el documento	1-15
A	PETER J. FRAZIER et al Lipid-protein Interaction During Dough Development. J. Sci. Food Agric. 1981. Vol 32 pag.877-897.	1-15
A	ARIS GRAVELAND et al. Extraction and Fraction of Wheat Flour Proteins. J. Sc. Food Agric. 1982. Vol.33 pag.1117-1128.	1-15

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

- \* Categorías especiales de documentos citados:
- "A" documento que define el estado general de la técnica no considerando como particularmente relevante.
- "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o la fecha posterior.
- "L" documento que plantea dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
- "D" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

- "T" documento anterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que es citado por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
- "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento individualmente considerado.
- "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro o a otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional 24/09/2002	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 26 SEP 2002 26. 09. 02
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. C/Panamá, 1, 28071-Madrid, España. nº dc fax +34 91 3495304	Funcionario autorizado Mar Ybarra Fernandez nº de teléfono + 34 91 34 95536

26/28

## INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES 02/00208

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
GB2207921	15.02.1989	AU1891788 AU611921 CA1294903	12.01.1989 27.06.1991 28.01.1992

Copy for the designated Office (DO/EP)

PCT/ES02/00208

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT  
**NOTIFICATION RELATING TO PRIORITY CLAIM**  
 (PCT Rules 26bis.1 and 26bis.2 and  
 Administrative Instructions, Sections 402 and 409)

Date of mailing (day/month/year) 10 September 2002 (10.09.02)
Applicant's or agent's file reference 200101098
International application No. PCT/ES02/00208

## From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

REPRESA SÁNCHEZ, Domingo  
 Consejo Superior de  
 Investigaciones Científicas  
 Oficina de Transferencia de  
 Tecnología  
 C/Serrano, 113 - 2<sup>a</sup> planta  
 E-28006 Madrid  
 Spain

Applicant <b>CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS et al</b>	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
---	-------------------------------

The applicant is hereby notified of the following in respect of the priority claim(s) made in the international application.

1.  Correction of priority claim. In accordance with the applicant's notice received on: 11 July 2002 (11.07.02), the following priority claim has been corrected to read as follows:

ES 14 May 2001 (14.05.01) P 200101098

- even though the indication of the number of the earlier application is missing.  
 even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:

EPO - DG 1

2.  Addition of priority claim. In accordance with the applicant's notice received on: , the following priority claim has been added:

23.09.2002

- even though the indication of the number of the earlier application is missing.  
 even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:

104

3.  As a result of the correction and/or addition of (e) priority claim(s) under items 1 and/or 2, the (earliest) priority date is:

4.  Priority claim considered not to have been made.

- The applicant failed to respond to the invitation under Rule 26bis.2(b) (Form PCT/B/316) within the prescribed time limit.  
 The applicant's notice was received after the expiration of the prescribed time limit under Rule 26bis.1(e).  
 The applicant's notice failed to correct the priority claim so as to comply with the requirements of Rule 4.10.

The applicant may, before the technical preparations for international publication have been completed and subject to the payment of a fee, request the International Bureau to publish, together with the international application, information concerning the priority claim. See Rule 26bis.2(c) and the PCT Applicant's Guide, Volume I, Annex B2(B).

5.  In case where multiple priorities have been claimed, the above item(s) relate to the following priority claim(s):

6. A copy of this notification has been sent to the receiving Office and  
 to the International Searching Authority (where the international search report has not yet been issued).  
 the designated Offices (which have already been notified of the receipt of the record copy).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Lazar Joseph PANAKAL Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**